



**SALINAN**

**KEPUTUSAN  
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN  
NOMOR 614/UN3.1.1/HK/2021**

**TENTANG**

**PANITIA UJIAN TAHAP PERTAMA (TERTUTUP)  
PROGRAM DOKTOR PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN ATAS NAMA NUR ROCHMAH, dr.,Sp.A(K).**

**DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN,**

- Menimbang : a. bahwa sehubungan dengan telah siap dilakukan ujian tahap pertama (tertutup) Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran, maka perlu dibentuk panitia ujian tahap pertama (tertutup);
- b. bahwa nama-nama yang tersebut di bawah ini telah memenuhi syarat dan bersedia untuk diangkat sebagai panitia ujian dimaksud;
- c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan huruf b, perlu menetapkan Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran tentang panitia ujian tahap pertama (tertutup) Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran.
- Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4301);
2. Undang-Undang Nomor 14 Tahun 2005 tentang Guru dan Dosen (Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 157, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4586);
3. Undang-Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5336);
4. Undang-Undang Nomor 5 Tahun 2014 tentang Aparatur Sipil Negara (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 06, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5494);
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 57 Tahun 1954 tentang Pendirian Universitas Airlangga Di Surabaya sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 3 Tahun 1955 tentang Pengubahan Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1954 Nomor 99 Tambahan Lembaran Negara Nomor 695 *juncto* Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1955 Nomor 4 Tambahan Lembaran Negara Nomor 748);

6. Peraturan Pemerintah Nomor 4 Tahun 2014 tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi dan Pengelolaan Perguruan Tinggi. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 16, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5500);
7. Peraturan Pemerintah Nomor 30 Tahun 2014 tentang Statuta Universitas Airlangga. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5535);
8. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 38 Tahun 2017 tentang Peraturan Pendidikan Universitas Airlangga;
9. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 21 Tahun 2014 tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor (S3) Universitas Airlangga;
10. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1947/H3/KR/2011 tentang Penetapan Ruang Lingkup Program Studi dalam Kategori Monodisiplin, Interdisiplin dan Multidisiplin untuk Pengelolaan Program Magister dan Program Doktor;
11. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 762/UN3/2020 tentang Pengangkatan Dekan Fakultas, Direktur Sekolah Pascasarjana, dan Direktur Rumah Sakit Periode 2020-2021.

#### **MEMUTUSKAN:**

- Menetapkan : **KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN TENTANG PANITIA UJIAN TAHAP PERTAMA (TERTUTUP) PROGRAM DOKTOR PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN ATAS NAMA NUR ROCHMAH, dr.,Sp.A(K).**
- PERTAMA** : Membentuk panitia ujian tahap pertama (tertutup) Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran atas nama Nur Rochmah, dr.,Sp.A(K) yang dilaksanakan pada tanggal, 22 November 2021 dengan susunan nama-nama sebagai berikut:
- Ketua : Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D  
 Anggota : 1. Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D  
 2. Dr. Anang Endaryanto, dr., Sp.A(K)  
 3. Prof. Dr. dr. Aman Bhakti Pulungan, Sp.A(K), FAAP, FRCPI (Hon)  
 4. Dr. Windhu Purnomo, dr., M.S  
 5. Dr. Bagus Setyoboedi, dr.,Sp.A(K)  
 6. Dr. Sony Wibisono, dr.,Sp.PD, K-EMD, FINASIM  
 7. Dr. Martono Tri Utomo, dr.,Sp.A(K)
- KEDUA** : Dalam menjalankan tugasnya sebagaimana dimaksud dalam diktum PERTAMA, berpedoman pada peraturan dan ketentuan yang berlaku serta mempertanggungjawabkan tugasnya kepada Dekan Fakultas Kedokteran.
- KETIGA** : Biaya untuk keperluan tersebut dibebankan pada dana Rencana Kegiatan dan Anggaran Tahunan (RKAT) Fakultas Kedokteran.

KEEMPAT: ...

KEEMPAT : Keputusan ini mulai berlaku sejak tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Surabaya  
pada tanggal 22 November 2021

DEKAN,

ttd

**BUDI SANTOSO**  
NIP 196302171989111001

Salinan sesuai dengan aslinya  
Koordinator Staf Dekanat

Basuni  
NIP 196501021987011001

SALINAN disampaikan Yth.

1. Rektor Universitas Airlangga
2. Wakil Dekan I,II,II
3. KPS terkait
4. Yang bersangkutan

Diterbitkan Untuk Ujian Akhir Tahap 1 (Tertutup)

**DISERTASI**

**POLIMORFISME GEN HLA-DQA1, HLA-DQB1, KADAR PROTEIN  
HLA-DQA1, HLA-DQB1, ANTIBODI *GLUTAMIC-ACID-  
DECARBOXYLASE- 65*, *ZINC-TRANSPORTER-8*, DAN *C-PEPTIDE* :  
STUDI PADA ANAK DENGAN DIABETES MELITUS TIPE-1**



**NUR ROCHMAH**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**DISERTASI**

**POLIMORFISME GEN HLA-DQA1, HLA-DQB1, KADAR PROTEIN  
HLA-DQA1, HLA-DQB1, ANTIBODI *GLUTAMIC-ACID-  
DECARBOXYLASE- 65*, *ZINC-TRANSPORTER-8*, DAN *C- PEPTIDE* :  
STUDI PADA ANAK DENGAN DIABETES MELITUS TIPE-1**



**NUR ROCHMAH**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**DISERTASI**

**POLIMORFISME GEN HLA-DQA1, HLA-DQB1, KADAR PROTEIN  
HLA-DQA1, HLA-DQB1, ANTIBODI *GLUTAMIC-ACID-  
DECARBOXYLASE- 65*, *ZINC-TRANSPORTER-8*, DAN *C-PEPTIDE* :  
STUDI PADA ANAK DENGAN DIABETES MELITUS TIPE-1**

**NUR ROCHMAH**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**POLIMORFISME GEN HLA-DQA1, HLA-DQB1, KADAR PROTEIN  
HLA-DQA1, HLA-DQB1, ANTIBODI *GLUTAMIC-ACID-  
DECARBOXYLASE- 65*, *ZINC-TRANSPORTER-8*, DAN *C- PEPTIDE* :  
STUDI PADA ANAK DENGAN DIABETES MELITUS TIPE-1**

**DISERTASI**

**Untuk memperoleh Gelar Doktor  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

Oleh :

**NUR ROCHMAH**

**011817017326**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**DISERTASI**

**POLIMORFISME GEN HLA-DQA1, HLA-DQB1, KADAR PROTEIN HLA-DQA1, HLA-DQB1, ANTIBODI GLUTAMIC-ACID-DECARBOXYLASE-65, ZINC-TRANSPORTER-8, DAN C-PEPTIDE :  
STUDI PADA ANAK DENGAN DIABETES MELITUS TIPE-1**

**TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 30 SEPTEMBER 2021**

Oleh:

Promotor

Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D  
NIP. 195002171978031002

Ko Promotor

Dr. Anang Endaryanto, dr., SpA(K)  
NIP. 19630423 198901 1003

Mengetahui:

**KPS Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., SpOG(K)  
NIP. 196108172016016101

**Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai  
Oleh panitia penguji Ujian Tahap 1 (Tertutup)  
pada Tanggal 22 November 2021**

**Panitia penguji:**

Ketua : Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D

Anggota : 1. Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D

2. Dr. Anang Endaryanto, dr., Sp.A(K)

3. Prof. Dr. dr. Aman Bhakti Pulungan, Sp.A(K), FAAP, FRCPI (Hon.)

4. Dr. Windhu Purnomo, dr., MS.

5. Dr. Sony Wibisono, dr., Sp.PD-KEMD, FINASIM

6. Dr. Bagus Setyo boedi, dr., Sp.A(K)

7. Dr. Martono Tri Utomo, dr., Sp.A(K)

## RINGKASAN

### POLIMORFISME GEN HLA-DQA1, HLA-DQB1, KADAR PROTEIN HLA-DQA1, HLA-DQB1, ANTIBODI *GLUTAMIC-ACID-DECARBOXYLASE-65*, *ZINC-TRANSPORTER-8*, DAN *C-PEPTIDE* : STUDI PADA ANAK DENGAN DIABETES MELITUS TIPE-1

Nur Rochmah

Diabetes melitus merupakan gawat darurat kesehatan global abad 21. Diabetes melitus tipe-1 (DMT1) adalah kelainan sistemik akibat terjadinya gangguan metabolisme glukosa yang ditandai oleh hiperglikemia kronik. Keadaan ini sebagian besar disebabkan oleh kerusakan sel- $\beta$  pankreas yang dipicu paparan faktor lingkungan pada individu dengan genetik risiko tinggi, sehingga terjadi reaksi autoimun yang diikuti dengan destruksi sel  $\beta$  pankreas. Polimorfisme genetik, antara lain pada *Human Leucocyte Antigen* (HLA) dan kadar antibodi pada individu dengan DMT1 dilaporkan bervariasi antar ras. *Precision medicine* melalui pendekatan *genomics* sebagai prediktor, pencegahan, dan terapi DM yang bersifat individual.

Data dari Unit Kelompok Kerja (UKK) endokrin anak nasional melaporkan jumlah DMT1 anak semakin meningkat dalam 10 tahun terakhir di Indonesia. Mortalitas terkait DM sebesar 4 juta orang secara global pada 2017 dengan beban pembiayaan negara sebesar 727 \$ USD. Beban pembiayaan DM disebutkan dua kali lebih besar dibandingkan kasus non-DM. Komplikasi akut ketoasidosis diabetikum (KAD) sering dijumpai saat diagnosis awal yaitu pada lebih kurang 25-40% penderita.

Polimorfisme gen HLA kelas II (DR, DQ, DP) paling sering dilaporkan sebagai faktor risiko dan faktor protektif dari DMT1. Lebih kurang 60% pasien DMT1 menunjukkan polimorfisme HLA kelas II, yaitu homozigot HLA-DR3 dan HLA-DR4. Faktor risiko terbesar didapatkan pada polimorfisme HLA DR3/4. Sedangkan HLA-DQB1\*0602; HLA-DRB1\*0401, HLA-DQA1\*0301, HLA-DQB1\*0301 dilaporkan sebagai faktor protektif DMT1. Data faktor risiko dan faktor protektif dari polimorfisme DMT1 tersebut bervariasi pada setiap ras. Polimorfisme genetik berhubungan dengan antibodi pada DMT1.

Sesuai teori dogma sentral, maka alur informasi genetik dari gen ke mRNA, mRNA ke asam amino. Gen HLA-DQA1 mensintesis protein HLA-DQA1, sedangkan gen HLA-DQB1 mensintesis protein HLA-DQB1. Gen HLA yang mengkode protein HLA kelas I dan II yang mempresentasikan peptida dari degradasi protein.

Penanda proses autoimun terkait DMT1 yang sudah dikenal adalah *Islet Cell Autoantibody* (ICA), *Insulin Autoantibody* (IAA), antibodi *Glutamic Acid Decarboxylase* (GAD), *Protein tyrosine phosphatase* (IA2), dan antibodi *Zinc-Transporter-8* (ZnT8). Antibodi tersebut dapat digunakan sebagai alat diagnostik DMT1, selain kadar *C-peptide*. Studi kohort *Finland Diabetes Prediction and Prevention* (DPP) melaporkan IAA yang paling sering dijumpai (320 anak) pada tahun kedua sakit. Karakteristik penderita DMT1 di Asia berbeda dengan Kaukasia. Pada populasi Asia didapatkan antibodi sel islet sangat rendah.

Periode antara serokonversi dan diagnosis sangat bervariasi, dalam rentang bulan sampai dengan tahun. Proses autoimun yang ditandai dengan penanda

autoimun positif ini, diikuti destruksi sel  $\beta$  pankreas. Pemeriksaan kadar *C-peptide* menggambarkan residual sel  $\beta$  pankreas. Peran polimorfisme *Human leucocyte antigen* (HLA), protein HLA, antibodi GAD-65, antibodi ZnT8 bervariasi antar ras. Data penelitian tentang topik tersebut di Indonesia masih terbatas. Studi ini bermaksud untuk mengevaluasi polimorfisme *Human Leucocyte Antigen* (HLA), protein HLA, antibodi GAD-65, antibodi ZnT8 pada DMT1 anak di Indonesia.

Desain penelitian adalah kasus kontrol. Riset dilakukan di poli endokrin anak RS dr Soetomo, Surabaya, pada periode Bulan April 2020 sampai September 2021. Pemeriksaan laboratorium dilakukan di *Tropical Disease Centre, Universitas Airlangga*. Kriteria inklusi kelompok DMT1 adalah pasien dengan DMT1 yang rutin kontrol selama periode riset, berusia 4-18 tahun, orang tua menyetujui untuk mengikuti penelitian dan menandatangani lembar persetujuan. Kriteria eksklusi kelompok kontrol adalah penderita non DMT1, usia 4-18 tahun, orang tua menyetujui untuk mengikuti penelitian dan menandatangani lembar persetujuan. Kriteria eksklusi kelompok kontrol adalah riwayat demam, penyakit autoimun, alergi, dan keganasan. Etik disetujui oleh komite etik penelitian Kesehatan RSU Dr Soetomo no. 1889/KEPK/III/2020.

Riset ini mengevaluasi polimorfisme gen HLA-DQA1 dan HLA-DQB1 dengan menggunakan metode PCR-RFLP. Genotyping dari HLA-DQA1 menggunakan PCR dengan primer *forward* DQAS34: 5'-GGTGTAACCTTGTACCAG-3', dan primer *reverse* DQAA261: 5'-ATTGGTAGCAGCGGTAGA-3' dan menghasilkan 228pb segmen DQA1. Proses RFLP dari polimorfisme HLA-DQA1 menggunakan enzim *RsaI* dan *DdeI* sebagai enzim restriksi. Sedangkan DQB1 menggunakan *forward primer* DQBS43: 5'-TGCTACT-TCACCAA(C/T)GGG-3' dan *reverse primer* DQBA249: 5'-GTAGTTGTGTCTGCA (C/T)AC-3' menghasilkan segmen 207pb DQB1. Proses RFLP dari polimorfisme HLA-DQB1 menggunakan enzim *MspI*, *Sau96I*, *Acyl*, dan *HhaI* sebagai enzim restriksi. Analisis protein HLA DQA1, DQB1, antibodi GAD-65, antibodi ZnT8 dilakukan dengan ELISA kit. Uji beda antara kelompok DMT1 dan kontrol dilakukan dengan menggunakan uji *Mann-whitney*. Data dianalisis menggunakan SPSS 17.0.

Tiga puluh satu pasien DMT1 dan 31 kontrol non DM mengikuti penelitian. Hasil pada studi ini dijumpai polimorfisme HLA-DQA1 yang paling sering dijumpai pada kelompok DMT1 adalah 0101/0102 (67,60%). Polimorfisme HLA-DQA1 0401/0501 dan 01/03/04 lebih sering didapatkan pada kelompok DMT1. Polimorfisme 01/03 dan 02/03 didapatkan pada kelompok DMT1 namun tidak didapatkan pada kontrol. Polimorfisme 01/04 dan 01/03/01 hanya dijumpai pada kontrol. Polimorfisme HLA-DQB1 pada grup DMT1 terbanyak adalah 0301 (54,80%). Polimorfisme HLA DQB1 0302 lebih sering dijumpai dikelompok DMT1. Polimorfisme HLA-DQB1 0502 lebih sering ditemukan pada kelompok kontrol. Polimorfisme HLA-DQB1 0403 tidak didapatkan di kelompok DMT1 namun didapatkan pada kelompok kontrol. Sedangkan polimorfisme HLA-DQB1 0401, 0402, 0501, 0503, 0601, dan 0604 didapatkan pada semua sampel kelompok DMT1 dan kontrol. Median protein HLA-DQA1 lebih tinggi pada grup DMT1 yaitu 2,12 ng/ml vs 1,89 ng/ml ( $p=0,13$ ) sedangkan median protein HLA-DQB1 lebih rendah pada grup DMT1 yaitu 1,72 ng/ml vs 2,12 ng/ml ( $p=0,19$ ). Median antibodi GAD-65 pada kelompok DMT1 vs kontrol sebesar 10,18 ng/ml vs kontrol 4,11 ng/ml ( $p=0,00$ ) dan median antibodi ZnT8 pada kelompok DMT1 vs kontrol 0,35

ng/ml vs 0,27ng/ml ( $p=0,00$ ). Median kadar *C-peptide* pada kelompok DMT1 vs kontrol yaitu 00,68 ng/ml vs 1,00 ng/ml ( $p=0,00$ ).

Pada studi ini didapatkan polimorfisme HLA-DQA1 dan DQB1 yang dijumpai pada populasi di Indonesia berbeda dengan populasi lain. Protein HLA-DQA1 lebih tinggi pada DMT1, sedangkan protein HLA-DQB1 lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Antibodi GAD-65 dan ZnT8 dijumpai lebih tinggi pada kelompok DMT1 pada studi ini. Kadar *C-peptide* dijumpai lebih rendah pada DMT1 dibandingkan kontrol. Pada analisis jalur didapatkan hubungan antara polimorfisme gen HLA-DQB1 dan *C-peptide* secara tidak langsung melalui antibodi GAD-65. Antibodi GAD-65 dan ZnT8 dapat dipakai sebagai diagnosis pada DMT1 selain kadar *C-peptide*.

## SUMMARY

### HLA-DQA1, HLA-DQB1 GENE POLYMORPHISM, HLA-DQA1, HLA-DQB1 PROTEIN LEVEL, GLUTAMIC-ACID DECARBOXYLASE-65 ANTIBODY, ZINC-TRANSPORTER-8 ANTIBODY, AND C-PEPTIDE: A STUDY IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

**Nur Rochmah**

Diabetes mellitus is a global emergency in 21<sup>st</sup> century. Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is glucose metabolism abnormality characterized with chronic hyperglycemia which is frequently due to auto immune process. Interaction between genetic polymorphism and environment factors triggered the autoimmune process. Human Leucocyte Antigen (HLA) polymorphism plays an important role in this process. More than half of autoimmune in T1DM reported to be mediated by HLA. Precision medicine offer a customized approach based on genomics as predictor, prevention, and treatment for T1DM.

Data from pediatric endocrinology working group stated that the prevalence of T1DM is increasing lately in Indonesia. Mortality of DM around 4 million people globally in 2017 with financial burden 727 \$ USD, which is double the non DM cases. Ketoacidosis as acute complication of DM, is frequently observed as the first clinical manifestation in T1DM.

Human Leucocyte Antigen polymorphism class II (DR, DQ, DP) is frequently reported as risk and protective factors in T1DM. Around 60 % of T1DM with homozygote HLA-DR3 and HLA-DR4. The strongest risk factor was mediated by HLA DR3/4 polymorphism. Meanwhile, HLA-DQB1\*0602; HLA-DRB1\*0401, HLA-DQA1\*0301, HLA-DQB1\*0301 as protection factor. These data on risk and protective factors for T1DM polymorphism varied between race. Genetic polymorphism associate to antibody markers in type 1 diabetes mellitus.

As informed by central dogma; genetic information directed from gene to mRNA, then to amino acid. Human Leucocyte Antigen (HLA) DQA1 gene produce HLA-DQA1 protein while HLA-DQB1 gene produce HLA-DQB1 protein. HLA gene encode class I and II HLA that present peptide from protein degradation.

Autoimmune markers related to T1DM such as ICA, IAA, GAD-65, IA2 and ZnT8 antibody. These antibodies markers are used as diagnosis tools for establishing diagnosis of type 1 diabetes mellitus beside C-peptide level. Cohort Finland Diabetes Prediction and Prevention (DPP) study reported that IAA was most prevalent in the second year of diagnosis. The clinical manifestation of T1DM in Asian is different from those in Caucasian. Islet antibody marker is less observed in Asian populations.

The duration of seroconversion and diagnosis is varied among patients. C-peptide is the marker for indicating the residual of beta pancreas cell which is used as one of the clinical diagnosis of T1DM. The role of HLA polymorphism, protein HLA, antibody markers, and C-peptide also different among races. This study aims to evaluate polymorphism HLA-DQA1, HLA-DQB1, protein HLA DQA1, DQB1, antibody GAD-65, antibody ZnT8 in Indonesian children with T1DM.

Research design was case control, conducted in pediatric endocrine Out Patient Clinic (OPC), dr Soetomo hospital, during April 2020 into September 2021. The

laboratories examination was performed in Tropical Disease Centre, Universitas Airlangga. Inclusion criteria for T1DM were patients with T1DM who regularly controlled in pediatric endocrine OPC dr Soetomo Hospital, aged 4-18 years old, parents agreed to join the study and signed the informed consent. Exclusion criteria was T1DM hospitalized in Pediatric Intensive Care Unit (PICU) due to severe illness. Meanwhile the inclusion for control group were non T1DM children, aged 4-18 years old, parents agreed and signed the inform consent. Exclusion criteria for control group were history of fever, autoimmune disease, allergy, and cancer.

The research evaluated HLA-DQA1 and HLA-DQB1 gene polymorphism by using PCR-RFLP. Human Leucocyte Antigen DQA1 genotyping was performed by using polymerase chain reaction (PCR) with forward primer DQAS34: 5'-GGTGTAACCTTGTACCAG-3' and reverse primer DQAA261: 5'-ATTGGTAGCAGCGGTAGA-3' resulting in 228bp DQA1 segment. The RFLP for HLA-DQA1 polymorphism process was done by using RsaI and DdeI as restriction enzyme. The PCR RFLP was using the PCR product. Meanwhile, for HLA-DQB1, forward primer DQBS43: 5'-TGCTACT-TCACCAA(C/T)GGG-3' and reverse primer DQBA249: 5'-GTAGTTGTGTCTGCA (C/T)AC-3' resulting in 207bp DQB1 segment. RFLP for HLA DQB1 polymorphism process was done by using MspI, Sau961, Acyl and HhaI as restriction enzyme. The PCR RFLP was using the PCR product. Analysis on protein HLA DQA1, DQB1, antibody GAD-65, antibody ZnT8 were done by using ELISA kit. Ethical was approved by dr Soetomo ethical board committee no. 1889/KEPK/III/2020. Comparison between T1DM group and control was analyzed by using Mann Withney test. The data were analyzed by using SPSS 17.0 version.

Thirty – one T1DM patients and 31 control join the study. The most common HLA-DQA1 subtype in T1DM group was 0101/0102 (67.60%). The HLA-DQA1 0401/0501 and 01/03/04 were frequently observed in T1DM group. Polymorphism HLA-DQA1 01/03 and 02/03 were found in T1DM group only, meanwhile 01/04 and 01/03/01 were found in control group only. The most common HLA-DQB1 subtypes in T1DM group was 0301 (54.80%). Polymorphism HLA-DQB1 0302 were frequently observed in T1DM group. Polymorphism HLA-DQB1 0502 were frequently found in control group. Polymorphism HLA-DQB1 0403 was found in control group only. Polymorphism HLA-DQB1 0401, 0402, 0501, 0503, 0601, and 0604 were found in all T1DM and control group. The median of protein HLA-DQA1 was higher in T1DM group compared to control (2,12 ng/ml vs 1,89 ng/ml) ( $p=0,134$ ), whether protein HLA-DQB1 was lower in T1DM group (1,72 ng/ml vs 2,12 ng/ml) ( $p=0,188$ ). The median of antibody GAD-65 in T1DM vs control was 10,18 ng/ml vs 4,11 ng/ml ( $p=0,000$ ) and the median of antibody ZnT8 was 0,35 ng/ml vs 0,27 ng/ml ( $p=0,000$ ). The median of C-peptide level in T1DM vs control was 0,68 ng/ml vs 1,00 ng/ml ( $p=0,000$ ).

In this study, the HLA-DQA1 and HLA-DQB1 polymorphism reported are different than the subtypes found in other populations. Protein HLA-DQA1 was higher in T1DM group compare to control, meanwhile protein HLA DQB1 was lower. The antibody markers, the GAD-65 and ZnT8 were higher in T1DM in our study, whether C-peptide level was lower in T1DM group. There is a significant relation between the polymorphism of HLA-DQB1 and C-peptide through the GAD-65. The antibody GAD-65 and ZnT8 can be used as diagnosis marker in T1DM patients beside C-peptide level.

## ABSTRACT

### HLA-DQA1, HLA-DQB1 GENE POLYMORPHISM, HLA-DQA1, HLA-DQB1 PROTEIN LEVEL, GLUTAMIC-ACID DECARBOXYLASE-65 ANTIBODY, ZINC-TRANSPORTER-8 ANTIBODY, AND C-PEPTIDE: A STUDY IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Nur Rochmah

**Background.** Human Leukocyte Antigen (HLA) polymorphism was reported to characterized genetic risk in Type-1 Diabetes Mellitus (T1DM). Data on gene, antibodies in T1DM in Indonesia are lacking. Therefore, this study is aimed to evaluate gene polymorphism of HLA-DQA1, HLA-DQB1, protein HLA-DQA1, HLA-DQB1, antibody GAD-65, ZnT8, and C-peptide in Indonesian children with T1DM.

**Methods.** Research design was case control. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 gene polymorphism was analyzed by using Polymerase-Chain-Reaction-Restriction-Fragment-Length-Polymorphism (PCR-RFLP). The primer for HLA-DQA1 was [forward: DQAS34:5'-GGTGTAACCTTGTACCAG-3'; reverse: DQAA261:5'-ATTGGTAGCAGCGGTAGA-3'] and HLA-DQB1 [forward: DQBS43:5'-TGCTACT-TCACCAA(C/T)GGG-3'; reverse: DQBA249:5'-GTAGTTGTGTCTGCA(C/T)AC-3']. HLA-DQA1, HLA-DQB1 proteins, antibodies GAD-65, ZnT8, and C-peptide were analyzed by using ELISA method.

**Results.** Thirty-one T1DM and thirty-one control patients joined our study. The most common HLA-DQA1 polymorphism in T1DM group was 0101/0102 (67.60%) and 0301 (54.80%) for HLA-DQB1. Comparison median of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 protein in T1DM vs control was (2,12 ng/ml vs 1,89 ng/ml) ( $p=0,13$ ), (1,72 ng/ml vs 2,12 ng/ml) ( $p=0,19$ ) respectively. The median of antibody GAD-65 and ZnT8 in T1DM vs control was [10,18 ng/ml vs 4,11 ng/ml ( $p=0,00$ )]; [0,35 ng/ml vs 0,27 ng/ml ( $p=0,00$ )] respectively. The median of C-peptide level in T1DM vs control was 0,68 ng/ml vs 1,00 ng/ml ( $p=0,00$ ).

**Conclusions.** HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA protein, GAD-65 and ZnT8 in Indonesian population are different compared to control. Protein HLA-DQA1, GAD-65 and ZnT8 were higher in T1DM, meanwhile protein HLA DQB1 and C-peptide were lower in T1DM. Antibody GAD-65 and ZnT8 can be used as diagnosis marker in T1DM.

**Keywords:** T1DM, HLA gene polymorphism, protein HLA, antibody